

***A PACAP ELŐFORDULÁSA A REPRODUKTÍV
RENDSZERBEN ÉS HATÁSAI TROPHOBLAST SEJTEK
TÚLÉLÉSÉRE ÉS JELÁTVITELI ÚTVONALAIRA***

Doktori (PhD.) értekezés tézisei

Dr. Brubel Réka

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai Intézet

Témavezetők:

Dr. Reglódi Dóra
egyetemi docens

Dr. Lubics Andrea
egyetemi adjunktus

Programvezető:

Dr. Csernus Valér
egyetemi tanár

Bevezetés

Hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)

A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidet, vagy angol neve alapján mozaikszóval PACAP-ot (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide), 1989-ben izolálták birka hypothalamusból, patkány hypophysisben kifejtett adenilát cikláz aktiváló hatása alapján. A PACAP a szekretin/glukagon/vazoaktív intestinális polipeptid (VIP) peptidcsalád tagja, melynek N-terminális szakasza (1-28) 68 %-ban megegyezik a VIP struktúrájával, de adenilát-cikláz aktiváló hatása 1000-10000-szer nagyobb a VIP hatásánál. 1990-ben azonosították 27 aminosavból felépülő, rövidebb fragsment, a PACAP27-et. A szervezetben két biológiailag aktív amidált forma kb. 90%-át a 38 aminosavból álló PACAP38, a kisebb részét a PACAP27 teszi ki. A peptidet a dipeptidil-peptidáz IV (DPP IV) bontja le, és nagyon rövid felezési ideje van testfolyadékokban. A degradáció során N-terminális rövidebb peptidok keletkeznek, melyek már biológiailag nem aktívak. Az N-terminális vég szükséges a biológiai aktivitáshoz, de a receptorkötéshez nem. Az így keletkezett peptidok, például a DPP IV által előállított PACAP3-38, a legtöbb esetben antagonistaként viselkednek. Ezen rövidebb fragsmentek közül a leghatásosabb antagonist a PACAP6-38.

A PACAP előfordulása a szervezetben

A PACAP a központi idegrendszerben legnagyobb mennyiségben a hypothalamusban mutatható ki. Más struktúrákban, így az agykéregben, a középagyban, a nyúltvelőben, a basalis ganglionokban, a thalamusban, a hypophysisben, a septumban, a hippocampus CA1-3 zónáiban, az amygdala centrális magjában, a cerebellumban és a retina különböző rétegeiben is vannak PACAP tartalmú sejtek és rostok. A perifériás idegrendszerben a spinális ganglionok kis érzőidegsejtjei, valamint a vegetatív prae- és postganglionáris neuronok tartalmaznak PACAP-ot.

A PACAP nemcsak a központi és perifériás idegrendszerben található meg, hanem más szövetekben is. Többek között az endokrin szervekben és a gastrointestinalis traktus teljes hosszában. A peptidet kimutatták többek között az adenohypophysisben, a

mellékvesében, az endokrin pancreasban és a mellékpajzsmirigyben. Ezen kívül megtalálható a kiválasztó rendszerben és a légzőrendszerben.

PACAP-receptorok

A PACAP hatását a szervezetben G-protein kötött receptorok közvetítik. A PAC1 receptor két-három nagyságrenddel nagyobb affinitással köti a PACAP-ot, mint a VIP-et, míg a VPAC-1 és VPAC-2 receptorok mindkét peptidet egyforma erősséggel kötik. A PACAP-ot nagyobb affinitással kötő PAC1 receptor típusok megtalálhatóak a központi idegrendszerben (a hypothalamus különböző területein, a cortexben, a thalamusban, a mesencephalonban, a ponsban és a kisagyban), az adenohypophysisben, a mellékvesevelőben és a herében.

A PACAP gonadális funkciókra kifejtett hatásai

A PACAP-nak a hypophysis hormonok szekréciójára kifejtett hatását már röviddel a felfedezését követően kimutatták. A peptid a GnRH-val interakcióban a gonadális funkciók központi szabályozásában vesz részt. Későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy a PACAP közvetlenül a gonadális sejtekre kifejtett hatással is rendelkezik, és fontos szerepet tölt be a genitális rendszerben. Immunhisztokémiai módszerekkel kimutatták a PACAP-ot és receptorait az ovariumban, ahol a PACAP fontos szerepet játszik a ovariális szteroidszintézisben, a tüszőérés szabályozásában és a granulosa sejtek proliferációjában. Ezen kívül a PACAP kimutatható a vaginában és az uterusban is. Valószínűleg az uteroplacentáris egység működésének szabályozásában is fontos szerepe van, mivel relaxációt okoz a bolyhok és a myometrium ereiben. A PACAP terhességben betöltött fontos szerepét támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a PACAP-knockout egerek fertilitása csökken. Az endometriumban a PACAP expresszió a decidualizáció és a terhesség során változik.

A PACAP protektív hatásának molekuláris mechanizmusai

A citoprotektív hatásokért csaknem minden esetben a PAC1 receptor felelős. A PACAP a PAC1 receptorokon keresztül aktiválja az adenilát ciklázt és a foszfolipáz C-t, melyek hatására cAMP- függő és attól független útvonalak aktiválódnak. A PKA aktiváció

hatására általában a védő hatású MAPK, az ERK foszforiláció megemelkedik, a sejtpusztulást elősegítő JNK és p38MAPK foszforiláció pedig gátlódik.

Célkitűzések

- A PACAP27 és PACAP38 kimutatása illetve koncentrációváltozásának meghatározása az érett, humán placentából (anyai centrális és perifériás, illetve magzati centrális és perifériás placentalrészekből), köldökzsinórból illetve 9 hetes abortumokból.
- PACAP38 kimutatása MALDI TOF tömegspektrométer segítségével különböző humán reprodukzív rendszerből származó mintákból.

3. PACAP1-38 és PACAP6-38 kezelés hatásának vizsgálata JAR sejtek (choriocarcinomás cytotrophoblast) jelátviteli útvonalaira illetve túlélésére normál körülmények között, H_2O_2 indukálta oxidatív stresszben, $CoCl_2$, lipopoliszacharid és etanol indukálta *in vitro* hypoxiában és citosztatikus kezelést követően.

Formázott: Felsorolás és számozás

4. PACAP1-38 és PACAP6-38 kezelés hatásának vizsgálata HIPEC sejtek (extravillosus cytotrophoblast) túlélésére normál körülmények között és citosztatikus kezelés hatására, illetve ezen sejtvonal inváziójára és proliferációjára.

Formázott: Felsorolás és számozás

Anyagok és módszerek

A PACAP előfordulása a placentában

A vizsgálat alapjául szolgáló mintákat 9 hetes humán abortumokból ($n=7$) és humán érett placentákból ($n=6$) nyertük. A vizsgálat során különbséget tettünk a magzati oldalon elhelyezkedő chorionboholy, és az anyai oldalt reprezentáló decidua között. Mindkét esetben a placenta perifériás és centrális részéből egyaránt vettünk mintákat. Ezen kívül köldökzsinórból ($n=6$) is meghatároztuk a PACAP38 és a PACAP27 koncentrációját. Első lépésben megmértük a szövetminták súlyát, majd jéghideg desztillált vízzel

homogenizáltuk azokat. A homogenátumot lecentrifugáltuk (12000 rpm, 4 °C, 30 min), a felülúszót radioimmunoassay (RIA) módszerrel dolgoztuk fel, és meghatároztuk a PACAP38 illetve a PACAP27 koncentrációját.

RIA módszer leírása röviden

Antiszérum: Az általunk használt PACAP38 antiszérumot carbodiimide által konjugált Cys²³-PACAP24-28 és borjú thyreoglobulin antigén ellen termeltetik nyúlban. A PACAP27 esetén a „88123-3” számú antiszérumot használtuk 1:45000 hígításban.

Jelöletlen antigén: Saját laboratóriumban készült mono-¹²⁵I izotóppal jódozott birka PACAP24-38 és birka PACAP27 (5000 cpm/ tubus). **Standard:** A RIA mérés során birka PACAP27 illetve PACAP38 peptidet (Sigma) használtunk standardként 0-1000 fmol/ml tartományban. **Pufferoldat (assay-puffer):** A RIA tesztekhez 1 ml 0,05 mol/l koncentrációjú (pH 7.4) foszfát pufferben végeztük. Az oldat összetevői: 0,25 % (w/v) BSA, 0,1 mol/l NaCl, 0,05 % (w/v) NaN₃. **Immunoassay eljárás (Radioimmunoassay-k menete):** a polipropilén RIA csövekbe (Merck) duplikátumban az alábbi inkubációs elegyet mértük be: 100 µl PACAP 27 vagy PACAP 38 standard, ill. mérni kívánt/ismeretlen minta, 100 µl antiszérum „88111-3” PACAP38 (1: 10000 hígításban), vagy „88123-3” PACAP27 (1:45000 hígításban), 100 µl (kb. 5000 cpm) ¹²⁵I izotóppal jelölt PACAP24-38 vagy PACAP27, assay-puffer. A mintákat az összekeverést követően 4 °C-on 48-72 óráig inkubáltuk. Ez után az antitesthez kötött jelölt antigén frakciót elválasztottuk a szabad jelölt peptidektől oly módon, hogy csövenként 100 µl szeparáló oldatot mértünk hozzá, melynek összetétele: 10 g mosott szén, 1 g dextrán, 0,5 g zsírmesztés tejpor, 100 ml desztillált víz. A csöveket 4 °C-on 15 percig 3000 rpm-en centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük, és itatós papírral leitattuk. A szénhez kötődött szabad peptidfrakció radioaktivitását (gamma sugárzást) NZ310 típusú spektrométeren megmértük. Ebből következtethetünk az ellenanyaghoz kötött radioaktivitás értékére, majd egy kalibrációs görbéről leolvashatjuk az ismeretlen minta PACAP38 vagy PACAP27 koncentrációját.

Tömegspektrometriai vizsgálatok

A tömegspektrometriai kísérletekhez a mintákat (tüszőfolyadék, magzatvíz, hüvelyváladék) rutin nőgyógyászati vizsgálatok alkalmával nyertük. A mintavételek külön beavatkozást nem igényeltek, az Intézmény Etikai Bizottság Kódex szabályainak betartásával történtek. A mintákhoz minden esetben peptidázgátlót (aprotinin) adtunk (30 µl/ml), kivéve a hüvelyváladékot, orrváladékot és nyálat, amik gyűjtése filter papírra történt. A tüszőfolyadékot önkéntes nőbetegektől nyertük (20-35 év között, n=40), akiknél kontrollált petefészek hyperstimulálás után mesterséges megtermékenyítés miatt tüszőfolyadék punkciót végeztek. A mintához (100 µl) hozzáadtunk 10 µl 72%-os triklórecetsavat és 100 µl desztillált vizet, majd lecentrifugáltunk (13000 rpm, 10 min).

A magzatvizet önkéntes várandósoktól nyertük a 16. terhességi héten végzett amniocentesis során, melynek oka a 35 év feletti anyai életkor volt (n=25). A mintákból 200 µl mennyiséget lecentrifugáltunk (10000 rpm, 5 min), a felülúszót 100 µl 1%-os trifluorecetsavval (TFA) savanyítottuk, majd ismét centrifugáltuk (13000 rpm, 10 min).

A további tisztítás céljára C18-as bevonatú Zip-Tip pipettahegyet (Millipore) használtunk. A vizsgálni kívánt polipeptidet a Zip-Tip felszíne megkötötte, majd innen a protokollnak megfelelően leoldva közvetlenül detektáltuk. A Zip-Tip felszínéről történő közvetlen leoldást 50%-os acetonitril és 0,1%-os TFA 1:1 arányú keverékével végeztük.

A hüvelyváladék (n=10) gyűjtéséhez steril filter papírcsíkokat (Schirmer papír, Mediker) használtunk, a mintaadók a ciklusuk progeszteron fázisában voltak. A papírcsíkok hüvelyváladékkal való átitatása minden esetben egy steril csipesszel történt, amivel a filter papírcsíkot a hüvely falához illesztettük 10 másodpercig.

A humán orrváladék (n=10, 20-40 év közöttiek) és nyál (n=10, 20-40 év közöttiek) mintákat önkéntesektől nyertük steril filter papírcsíkok (Schirmer papír Mediker) használatával.

A humán csarnokvizet (n=10, 65-85 év közöttiek) önkéntesektől nyertük szürkehályog miatti műtét alkalmával.

A natív mintáinkat, illetve a PACAP-38 vizes oldatú standardjének (Sigma-Aldrich) 1–1 µl-ét felvittük a Bruker rozsdamentes acél mintatartó tálcára (MTP 384 massive target T, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Vizsgálataink során mátrixként α -ciano-4-

hidroxí-fahéjsav (CHCA) telített 0,1 %-os trifluor-ecetsav (TFA) – acetonitril (2/1 V/V) oldatát alkalmaztuk, melyből mintáinkhoz 1-1 µl-t csepegtettünk. Kalibráló oldatként minden esetben a Bruker Peptidkalibráló Standardot alkalmaztuk (#206195 Peptide Calibration Standard; Bruker Daltonics). A minták beszáradását követően az elemzéseket a már fent említett Bruker Daltonics Autoflex II típusú MALDI TOF/TOF tömegspektrométerrel reflektor detektálási módban végeztük el. Az ionizáláshoz 337 nm-es nitrogén lézert alkalmaztunk (MNL-205MC model; LBT- Lasertechnik Berlin GmbH.; Berlin; Németország), ennek frekvenciája 50 Hz, a gyorsító feszültség 20 kV és a késleltetési idő pedig 120 ns volt. A tömegspektrumokat pozitív ionizációs módban 1000 és 10000 m/z tartomány között regisztráltuk. Minden minta esetében a peptidkeverékre jellemző tömegspektrumokat (1000 lövés/minta) összesítettük. A műszer ellenőrzését Bruker FlexContol 2.4 szoftverrel, az értékelést pedig Bruker FlexAnalysis 2.4 szoftverrel végeztük.

Sejtkultúra

Immortalizált sejtvonalak

Kísérleteink során JAR sejteket illetve HIPEC sejteket használtunk. A JAR sejtek choriocarcinomás cytotrophoblast sejtek, tenyésztésük RPMI-1640 médiumban történik. A HIPEC sejtek extravillosus cytotrophoblast sejtek, ezek tenyésztését DMEM médiumban végeztük.

Sejtek életképességének vizsgálata

A JAR sejtek életképességének vizsgálatához kolorimetrikus MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) tesztet használtunk. A sejteket egy 96-lyukú tenyésztő edénybe választottuk szét, ahol a kezdeti koncentráció 10^4 sejt/200 µl médium/lyuk volt. Ezt követően egy éjszakán át tenyésztettük őket RPMI médiumban.

A; PACAP38 hatása JAR sejtekre különböző toxikus hatások esetében

A sejteket tizenkét különböző csoportra osztottuk: 1.) a.) kezelésben nem részesült csoport b.) 100 nM PACAP 38-al kezelt csoport. 2.) a.) 0,45 mM H₂O₂ -dal kezelt

csoport, b.) 100 nM PACAP38-al előkezelt, majd 0,45 mM H₂O₂ -dal kezelt csoport. 3.) a.) 0,9 mM H₂O₂-dal kezelt csoport, b.) 100 nM PACAP38-al előkezelt, majd 0,9 mM H₂O₂-dal kezelt csoport. 4.) a.) 75 μM CoCl₂-dal kezelt csoport, b.) 100 nM PACAP38-al előkezelt, majd 75 μM CoCl₂-dal kezelt csoport. 5.) a.) 1 μg/ml lipopoliszacharid-al (LPS) kezelt csoport, b.) 100 nM PACAP38-al előkezelt, majd 1 μg/ml lipopoliszacharid-al (LPS) kezelt csoport. 6.) a.) 200 mM etanollal kezelt csoport, b.) 100 nM PACAP38-al előkezelt, majd 200 mM etanollal kezelt csoport.

A kontroll sejteket nem kezeltük előzetesen PACAP38-al, azonban azon sejtcsoportok esetében, melyek 9 órán keresztül különböző toxikus hatásoknak voltak kitéve, 1 órával az expozíció előtt 100 nM PACAP38 kezelést is végeztünk.

B; PACAP38 hatása JAR sejtekre citosztatikus kezelés esetében

~~24.)~~ A sejteket huszonnégy különböző csoportra osztottuk: 1.) kezelésben nem részesült csoport, 2.) 100 nM PACAP1-38-al kezelt csoport, 3.) 1 μM PACAP6-38-al kezelt csoport 4.) 100 nM PACAP1-38-al és 1 μM PACAP6-38-al kezelt csoport, 5.) 10 μM MTX-al kezelt csoport, 6.) 100 nM PACAP1-38-al és 10 μM MTX-al kezelt csoport 7.) 1 μM PACAP6-38-al és 10 μM MTX-al kezelt csoport, 8.) 100 nM PACAP1-38-al, 1 μM PACAP6-38-al és 10 μM MTX-al kezelt csoport 9.) 100 μM MTX-al kezelt csoport, 10.) 100 nM PACAP1-38-al és 100 μM MTX-al kezelt csoport, 11.) 1 μM PACAP6-38-al és 100 μM MTX-al kezelt csoport, 12.) 100 nM PACAP1-38-al, 1 μM PACAP6-38-al és 10 μM MTX-al kezelt csoport, 13.) kezelésben nem részesült csoport, 14.) 1 nM PACAP1-38-al kezelt csoport, 15.) 100 nM PACAP6-38-al kezelt csoport, 16.) 1 nM PACAP1-38-al és 100 nM PACAP6-38-al kezelt csoport, 17.) 10 μM MTX-al kezelt csoport, 18.) 1 nM PACAP1-38-al és 10 μM MTX-al kezelt csoport, 19.) 100 nM PACAP6-38-al és 10 μM MTX-al kezelt csoport, 20.) 1 nM PACAP1-38-al, 100 nM PACAP6-38-al és 10 μM MTX-al kezelt csoport, 21.) 100 μM MTX-al kezelt csoport, 22.) 1 nM PACAP1-38-al és 100 μM MTX-al kezelt csoport, 23.) 100 nM PACAP6-38-al és 100 μM MTX-al kezelt csoport, 24.) 1 nM PACAP1-38-al, 100 nM PACAP6-38-al és 10 μM MTX-al kezelt csoport

A kontroll sejteket ebben az esetben sem kezeltük előzetesen sem PACAP1-38-al, sem PACAP6-38-al. Azon sejtcsoportok esetében, melyek 48 órán keresztül citosztatikum

Formázott: Felsorolás és számozás

hatásának voltak kitéve, 1 órával az expozíció előtt PACAP1-38 vagy PACAP6-38, vagy együttes kezelést is végeztünk. A kezelést követően a médiumokat lecseréltük egy 0,5%-os MTT tartalmú RPMI médiumra, melyben 4 óráig inkubáltuk a sejteket. A reakciót 10 mM HCl hozzáadásával termináltuk. Ezt követően az abszorbanciát ELISA leolvasó segítségével 570 nm hullámhosszon megmértük, amely arányos volt az élő sejtek számával. Minden kísérletet háromszor ismételtünk.

HIPEC SEJTEK

A HIPEC sejtek életképességének vizsgálatához kolorimetrikus WST-1 tesztet használtunk. A sejteket szintén 96-lyukú tenyésztő edénybe választottuk szét, ahol a kezdeti koncentráció 10^4 sejt/100 μ l médium/lyuk volt. Ezt követően egy éjszakán át tenyésztettük őket DMEM médiumban.

A sejteket hat különböző csoportra osztottuk: 1.) kezelésben nem részesült csoport, 2.) 100 nM PACAP1-38-al kezelt csoport, 3.) 1 μ M PACAP6-38-al kezelt csoport, 4.) 10 μ M MTX-al kezelt csoport, 5.) 100 nM PACAP1-38-al és 10 μ M MTX-al kezelt csoport 6.) 1 μ M PACAP6-38-al és 10 μ M MTX-al kezelt csoport. A kontroll sejteket ebben az esetben sem kezeltük előzetesen sem PACAP1-38-al, sem PACAP6-38-al. Azon sejtcsoportok, melyek 48 órán keresztül citosztatikum hatásának voltak kitéve, 1 órával az expozíció előtt PACAP1-38 vagy PACAP6-38 kezelésben is részesültek. Az inkubációs idő lejártakor a 100 μ l médiumokhoz 10 μ l WST-1 reagenst adtunk. Ezt követően 2-3 órán keresztül inkubáltuk a sejteket. Az abszorbanciát ELISA leolvasó segítségével 420-480 nm hullámhosszon megmértük, amely arányos volt az élő sejtek számával. Minden kísérletet háromszor ismételtünk.

Inváziós készség és proliferáció vizsgálata

A HIPEC sejtek inváziós készségének vizsgálatát inváziós kamrákban végeztük a Boyden kamra protokoll alapján. Minden kamrában található egy beillesztés amelyben van egy 8 μ m pórus nagyságú polikarbonát membrán. Ezen kívül a membránokon található egy patkány farokból származó I. típusú kollagén bevonat ($5\mu\text{g}/\text{cm}^2$). A beillesztéseket először DMEM médiummal mostuk majd 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk.

Ezután minden beillesztésbe 5×10^5 sejtet helyezünk 100 μ l FCS mentes médiummal, a kamrákba szintén 5×10^5 sejt kerül 400 μ l FCS mentes médiummal. A sejteket 72 órán át tenyésztjük inkubátorban (37°C , 5% CO_2). Az inkubáció lejárta után a felülúszót eltávolítottuk és a kollagénbe betört életképes sejteket jelöltük 400 μ l crystal violet sejtfestékkel 20 percig szobahőmérsékleten. Majd leöblítettük a sejteket néhányszor vízzel és a kollegénbe nem betörő sejteket vattával eltávolítottuk. Ezek után a beillesztést egy teljesen új kamrába helyeztük és 200 μ l H_2O :etanol:aceticétsav (49:50:1) keveréket adtunk hozzá. Ezekből az oldatokból 100 μ l-eket 96-lyukú tenyésztő edényekbe pipettáztunk ahol kolorimetrikus WST-1 teszttel 560 nm-en meghatároztuk a abszorbanciát, ami arányos a sejtkoncentrációval. A proliferációs vizsgálatot a kamrákban található sejteken végeztük paralell az inváziós készség meghatározásával. A médium eltávolítása után 400 μ l FCS mentes 20% 96 Aqueous One solution tartalmú reagenst adtunk a sejtekhez. Majd inkubáltuk 3 órán át inkubátorban (37°C , 5% CO_2). Ezekből az oldatokból szintén 100 μ l-eket pipettáztunk 96-lyukú tenyésztő edényekbe majd kolorimetrikus WST-1 teszttel 560 nm-en meghatároztuk a abszorbanciát, ami arányos a sejtkoncentrációval.

Western blot analízis

A JAR sejteket 6 lyukú tenyésztő edénybe szeparáltuk szét, ahol a kezdeti koncentráció 5×10^5 sejt/ml/lyuk volt.

A.) PACAP1-38 és PACAP6-38 hatása JAR sejtekre

JAR sejteket négy különböző csoportra osztottuk: 1.) kontroll csoport, 2.) 1 órási 100 nM PACAP38-al kezelt csoport, 3.) 1 órási 1 μ M PACAP6-38-al kezelt csoport, 4.) 1 órási 100 nM PACAP38-al és 1 μ M PACAP6-38-al együttesen kezelt csoport.

B.) PACAP1-38 hatása JAR sejtekre H_2O_2 kezelés esetében

A JAR sejteket négy különböző csoportra osztottuk: 1.) kontroll csoport, 2.) 9 órán keresztül 0,6 mM H_2O_2 -dal kezelt csoport, 3.) 1 órási 100 nM PACAP38-al előkezelt, majd 9 órási 0,6 mM H_2O_2 -dal kezelt csoport, 4.) 1 órási 100 nM PACAP38-al kezelt csoport.

A sejteket a kezelést követően összegyűjtöttük, majd jéghideg Tris pufferben (50 mM, pH: 8,0) homogenizáltuk. A puffer összetevői: Foszfátáz inhibitor Na_3VO_4 (0,5 mM), proteáz inhibitor, PBS. A sejtmembránokat ultrahanggal roncsoltuk, majd 10000 x g sebességgel centrifugáltuk 15 percen keresztül. A felülúszó protein koncentrációját BioRad assay módszer segítségével meghatároztuk, a minták protein tartalmát egyenlő koncentrációkra állítottuk be. Azonos mennyiségű fehérjét (10 μg) 8, 12 és 15 %-os poliakrilamid gélben futtattunk. A blottolást követően, a nitrocellulóz membránt 3%-os zsírmentes tejben a következő polyclonalis nyúl vagy monoclonalis egér IgG ellen termeltetett antitesteket tartalmazó oldatban egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk: Phospho-protein kinase B (p-Akt), Phospho-p44/42 mitogen activated protein kinase (p-ERK1/2 Thr 202/Tyr204), Phospho-p38 mitogen activated protein kinase (p-p38 MAPK Thr180/Tyr 182). A második antitest peroxidáz-konjugált anti-nyúl, valamint anti-egér IgG volt, a vizualizálást ECL Western blot meghatározó rendszer kemilumineszcens szubsztrát (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) használatával végeztük el. Az előhívott filmeket NIH's Image J szoftver segítségével értékeltük. Minden kísérletet legalább három alkalommal végeztünk el.

Apoptózis és nekrosis detektálása annexin V/propidium jodid festéssel

A JAR sejteket 6 lyukú tenyésztő edénybe szeparáltuk szét, ahol a kezdeti koncentráció 10^5 sejt/2ml/lyuk volt.

JAR sejteket hat különböző csoportra osztottuk: 1.) kontroll csoport, 2.) 100 nM PACAP1-38-al kezelt csoport, 3.) 10 μM MTX-al kezelt csoport, 4.) 100 μM MTX-al kezelt csoport, 5.) 100 nM PACAP1-38-al és 10 μM MTX-al kezelt csoport, 6.) 100 nM PACAP1-38-al és 100 μM MTX-al kezelt csoport.

A HIPEC sejteket szintén 6 lyukú tenyésztő edénybe szeparáltuk szét, ahol a kezdeti koncentráció 10^5 sejt/2ml/lyuk volt.

HIPEC sejteket hat különböző csoportra osztottuk: 1.) kontroll csoport, 2.) 100 nM PACAP1-38-al kezelt csoport, 3.) 1 μM PACAP6-38-al kezelt csoport, 4.) 10 μM MTX-

al kezelt csoport, 5.) 100 nM PACAP1-38-al és 10 μ M MTX-al kezelt csoport, 6.) 1 μ M PACAP6-38-al és 10 μ M MTX-al kezelt csoport.

Az eljárás a sejthalál típusainak elkülönítésére alkalmas. Az apoptózis korai szakaszában változások figyelhetők meg a plazmamembránban. Az apoptotikus sejtek membránjában a foszfolipid-foszfátidilszerin a belső felszínről a külső felszínre transzlokálódik. Az annexinV igen nagy affinitást mutat a foszfolipid-foszfátidilszerinhez. A fluoreszcens festékkel (FITC) jelzett annexinV alkalmas az apoptotikus sejtek áramlási citometriás kimutatására. Az annexinV-t propidium jodid festéssel együtt alkalmaztuk és így az annexinV pozitív apoptotikus sejtek elkülöníthetővé váltak a propidium jodid pozitív nekrotikus sejtektől (Vermes et al., 2000). A mintákat BD FACS Calibur flow citométerrel vizsgáltuk, az analízishez Cellquest software-t használtunk. Kvadráns dot plot segítségével meghatározható az élő, a nekrotikus (propidium jodid pozitív), a korai apoptotikus (annexin-V pozitív), valamint a késői apoptotikus (annexin-V és propidium jodid pozitív) sejtek százalékos aránya.

Statistika

Eredményeinket átlag \pm S.E.M. formában adtuk meg. Az eredmények adatait ANOVA teszttel hasonlítottuk össze, melyet Neuman–Keul's *post hoc* analízis követett. A $P < 0.05$ eredmények esetén az eltérést szignifikánsnak tekintettük.

Eredmények

A PACAP előfordulása a placentában

A RIA eljárás segítségével sikerült a PACAP38 és PACAP27 immunreaktivitást kimutatnunk humán placentából. A PACAP38 szignifikánsan magasabb koncentrációban fordult elő a humán placenta anyai centrális és perifériás illetve a magzati centrális és perifériás részében mint a PACAP27. A peptid mindkét formája alacsony koncentrációban volt jelen a köldökszinóban, de a PACAP38 szintje itt is szignifikánsan magasabb volt a PACAP27 szintjénél. A PACAP mindkét formája detektálható volt a 9 hetes abortumok anyai és magzati oldalából vett mintákból egyaránt. A PACAP27 szintje

csak a magzati oldalon mutatott szignifikáns emelkedést a terhesség előrehaladtával, ezzel szemben a PACAP38 koncentrációja mind a magzati, mind az anyai oldalon szignifikánsan emelkedett a terminushoz közeledve.

Tömegspektrometriai vizsgálatok

Kísérleteink során humán tüszőfolyadék, magzatvíz, hüvelyváladék, nyál, orrváladék és csarnokvíz mintákat a PACAP standarddal együtt MALDI TOF tömegspektrométer segítségével vizsgáltuk. A PACAP-38 kvázi-molekula ionját (MW: 4534.6 Da) a standardban és mind a 40 tüszőfolyadékban detektáltuk. A humán magzatvíz, hüvelyváladék, nyál, orrváladék és csarnokvíz esetében nem tudtuk kimutatni a PACAP38-ra jellemző csúcsot. Ezt követően a tüszőfolyadékban elvégeztük a PACAP38 csúcs fragmentációját MALDI TOF/TOF alkalmazásával. A kísérlet eredményeként kapott y fragmensek egyezést mutattak a korábbi vizsgálatok alapján rendelkezésre álló a PACAP38 szülő ion y fragmenseivel és aminosav szekvenciáival. Így kapott eredményeink egyértelműen bizonyítják a PACAP-38 jelenlétét humán tüszőfolyadékban.

PACAP hatása choriocarcinoma sejtek túlélésére

A. PACAP38 hatása JAR sejtekre különböző toxikus hatások esetében

A PACAP38 kezelés önmagában nem befolyásolta a JAR sejtek túlélését. Meglepő módon nem találtunk protektív hatást azon sejtekenél sem, melyek eltérő koncentrációjú H_2O_2 -dal és PACAP38-al lettek kezelve. Sőt, ezen sejtek túlélési arányát az oxidatív stressz és a PACAP38 együttes alkalmazása csökkentette, ez a hatás erőteljesebben mutatkozott azonban a magasabb H_2O_2 koncentráció esetén. Hasonló eredményt láttunk azon csoportnál, amely $CoCl_2$ okozta kémiai hypoxiában szenvedett, itt is csökkentette a sejtek túlélési arányát a kettős kezelés. Nem figyelhető meg szignifikáns változás a túlélési arányban LPS vagy etanol hatására sem.

B. PACAP38 hatása JAR sejtekre citosztatikus kezelés esetében

A JAR sejtek túlélését sem a PACAP1-38, sem a PACAP6-38 kezelés önmagában, sem együttes alkalmazásuk nem befolyásolta. A citosztatikus kezelés hatására a sejttúlélés szignifikáns mértékben lecsökkent. Meglepő módon abban az esetben sem találtunk sem

protektív, sem toxikus hatást azon sejtekenél, melyek eltérő koncentrációjú MTX–al és PACAP1-38-al vagy PACAP6-38-al vagy ezek kombinációjával lettek kezelve.

PACAP hatása extravillosus cytotrophoblast sejtek túlélésére

A HIPEC sejtek túlélését sem a PACAP1-38, sem a PACAP6-38 kezelés önmagában nem befolyásolta. Ezen sejtvonal esetében sem találtunk védő, vagy toxikus hatást azoknál a sejtcsoportoknál, melyek MTX–al és PACAP1-38-al vagy PACAP6-38-al lettek kezelve.

PACAP hatása extravillosus cytotrophoblast sejtek inváziójára és proliferációjára

A HIPEC sejtek inváziós készségét a PACAP1-38 gátolta, viszont proliferációját elősegítette. A PACAP6-38 az invázióra semmilyen hatást nem gyakorolt, viszont a proliferációt szignifikáns mértékben fokozta.

PACAP hatásai choriocarcinoma sejtek jelátviteli útvonalaira

A.) PACAP1-38 és PACAP6-38 hatása JAR sejtekre

ERK1/2

Az ERK1/2 aktív, foszforilált formáját kimutattuk a kontroll sejtekenél, expressziója azonban PACAP1-38 kezelést követően nem változott. Ezen jelátviteli útvonal aktivációja szignifikáns emelkedést mutatott PACAP6-38 alkalmazása esetén, hasonló emelkedés volt megfigyelhető PACAP1-38 és PACAP6-38 kombinált kezelése esetében.

p38 MAPK

A p38 MAPK aktivációja esetében az ERK1/2-el ellentétes eredményeket kaptunk. A p38 MAPK foszforilációja kis mértékben csökkent PACAP1-38 hatására, majd szignifikáns csökkenést mutatott PACAP6-38 kezelés hatására. PACAP1-38 és PACAP6-38 együttes

alkalmazás esetén ez a szignifikáns aktiváció csökkenés még nagyobb mértékben volt megfigyelhető.

JNK/SAPK

A JNK/SAPK aktivációja csak kis mértékben volt kimutatható a kontroll sejtek esetében. Foszforilációja már szignifikáns mértékben emelkedett csak PACAP1-38 kezelés hatására is, még nagyobb emelkedést mutatott PACAP6-38 esetében. Kombinált alkalmazásuk esetében ez az aktiváció még jobban megemelkedett.

B.) PACAP1-38 hatása JAR sejtekre H_2O_2 kezelés esetében

Akt

Az Akt aktív formáját kimutattuk a kontroll sejteknél, expressziója azonban PACAP1-38 kezelést követően jelentős mértékben csökkent. Hasonló hatást figyelhattunk meg azoknál a sejteknél, melyek csak oxidatív stressznek voltak kitéve. Abban az esetben, amikor a sejteket PACAP1-38 előkezelést követően H_2O_2 -dal kezeltük, ezen protektív jelátviteli út vonal aktivációja még szignifikánsabb mértékben lecsökkent.

ERK1/2

Kísérletünk során nem volt kimutatható aktivitásváltozás annál a sejtcsoportnál, mely csak PACAP38 kezelésben részesült a kontroll sejtekhez viszonyítva. A ERK1/2 foszforilációja szignifikánsan lecsökkent azoknál a sejteknél, melyek csak oxidatív stresszben részesültek, illetve további szignifikáns csökkenést mutat abban az esetben, amikor a sejtek mindkét hatásnak ki voltak téve.

p38 MAPK

A p38 MAPK foszforilációja nem változott abban az esetben, amikor a sejtek csak PACAP kezelésben részesültek, illetve akkor sem, mikor a H_2O_2 által kifejtett oxidatív stresszben szenvedtek. A PACAP és a H_2O_2 egyidejű alkalmazása esetén viszont ezen protektív jelátviteli út vonal aktivációja szignifikáns csökkenést mutat.

Apoptózis és nekrosis detektálása annexin V/propidium jodid festéssel JAR sejtekenél

A flow citométerrel kapott eredményeink azt mutatják, hogy a MTX-kezelt csoportban az élő sejtek száma szignifikánsan csökkent mind 10 μ M, mind pedig 100 μ M alkalmazott koncentráció esetén. A PACAP1-38-kezelés önmagában nem okozott eltérést a kontroll sejtcsoporthoz képest, ezen kívül sem védő sem toxikus hatást nem fejtett ki egyik MTX koncentrációval szemben sem.

Apoptózis és nekrosis detektálása annexin V/propidium jodid festéssel HIPEC sejtekenél

A flow citométerrel kapott eredményeink ebben az esetben is azt mutatják, hogy a MTX-al (10 μ M) kezelt csoportban az élő sejtek száma szignifikánsan csökkent. A PACAP1-38 illetve a PACAP6-38 kezelés önmagában nem okozott eltérést a kontroll sejtcsoporthoz viszonyítva, ezen kívül ebben az esetben sem mutattak sem védő, sem toxikus hatást a MTX kezeléssel szemben.

Megbeszélés

A PACAP előfordulása a placentában

Kísérleteink során mind a PACAP38-at, mind a PACAP27-et kimutattuk a humán érett placenta minden részében, a PACAP38 magasabb, a PACAP27 alacsonyabb koncentrációban fordult elő. A PACAP placentában mért koncentrációtartománya közel azonos az agyban mért koncentrációtartománnyal, ahol a legmagasabb a peptid szintje az egész szervezetben. Eredményeink azt mutatják, hogy a PACAP szintje emelkedik a terhesség előrehaladtával, mind az anyai, mind a magzati oldalon. Ez jól korrelál korábbi kísérleti eredményekkel, melyek szerint a PACAP mRNS és a PAC1 receptor mRNS szintje emelkedik a terminushoz közeledve. A PACAP magas koncentrációjából arra következtethetünk, hogy a peptid fontos szerepet tölthet be a placentában. Ezt a feltételezést támasztja alá PACAP knockout egerek csökkent fertilitása és implantációs képessége.

A PACAP előfordulása a reprodukzív rendszer egyéb részeiben

Vizsgálataink alapján kimutattuk, hogy a PACAP38 megtalálható az általunk vizsgált összes humán tüszőfolyadékban. A tüszőfolyadék médiumként szolgál a fejlődő petesejt számára, illetve fontos szerepet tölt be a germinális sejtek morfológiai és funkcionális fejlődésében. A PACAP kimutatható fejlődési stádiumtól függően a nagy érett tüszők granulosa sejtjeiben peteérés előtt. Kisebb mennyiségben azonban éretlen antrális és preantrális tüszőkben is expresszálódik. Ezen kívül kimutatták a PACAP receptort is a fejlődő tüszőkben. A sárgatestben mind a PACAP-ot, mind a PAC1 receptort kimutatták. Valószínű, hogy a peptid szerepet játszik a primordiális csírasejtek proliferációjában, az éretlen tüszők ciklikus kiválasztódásában és a fejlődés elindításában, a petesejtek meiotikus fejlődésében és a petefészek hormon- illetve enzim termelésében. Eredményünk, hogy a PACAP kimutatható az általunk vizsgált összes tüszőfolyadékból, alátámasztja a feltételezést, hogy a PACAP fontos biológiai szerepet tölt be a tenyésztő folyadékként funkcionáló tüszőfolyadékban a fejlődő petesejtek számára. Ennek tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Humán magzatvízben, hüvelyváladékban, orrváladékban, nyálban és csarnokvízben nem tudtuk kimutatni a PACAP-ot tömegspektrométer segítségével. Ennek oka lehet a PACAP teljes hiánya ezen mintákban, vagy a peptid szintje annyira alacsony, hogy nem éri el a detektálási limitet. A peptid hiánya ebben az esetben nem feltétlenül zárja ki azt a lehetőséget, hogy a PACAP megtalálható kóros elváltozások esetében, mivel az általunk vizsgált minták olyan önkéntes nőbetegtől vagy egészséges önkéntesektől származtak, akik anamnézisében nem volt ismert betegség. A gyors lebomlás kizárható, mivel a mintákhoz megfelelő mennyiségű peptidáz-gátlót adtunk. Ezen kívül előfordulhat, hogy a peptid egy módosult formában van jelen az általunk vizsgált mintákban, melynek kiderítése még további vizsgálatokat igényel.

PACAP hatásai choriocarcinoma sejtek túlélésére és jelátviteli útvonalaira

PACAP38 hatása JAR sejtekre különböző toxikus hatások esetében

Vizsgálatainkban a PACAP kezelés számos hatását leírtuk JAR sejtek túlélését és jelátviteli útvonalait illetően. Arra az eredményre jutottunk, hogy egy órás PACAP1-38 előkezelés nem változtatta meg szignifikánsan a trophoblast sejtek túlélési arányát, viszont azoknál a sejteknél, melyek oxidatív stressznek és hypoxiának is ki voltak téve, a PACAP1-38 előkezelés szignifikánsan csökkentette a túlélést. Ebből arra következtethetünk, hogy a PACAP38 potenciózza ezen toxikus hatásokat. Ezt nem figyelhetjük meg azoknál a csoportoknál, amelyek LPS, etanol vagy MTX kezelést kaptak.

PACAP1-38 és PACAP6-38 hatása JAR sejtekre

Eredményeink azt mutatják, hogy a PACAP1-38 kezelés önmagában nem változtatta meg az ERK1/2 és a p38MAPK foszforilációját. Az ERK1/2 esetében a PACAP6-38 szignifikánsan emelte ezen jelátviteli útvonal aktivációját, ugyanezt a hatást figyelhetjük meg kombinált alkalmazásukat követően. A p38MAPK esetében pont ellenkező hatást figyelhattunk meg, a PACAP6-38 és a PACAP1-38 való együttes alkalmazása esetén ezen jelátviteli útvonal foszforilációja szignifikáns mértékben lecsökkent. A JNK/SAPK jelátviteli útvonal esetében a PACAP1-38 kezelés szignifikáns aktivációemelkedést hozott létre, amely ugyan fokozódott PACAP6-38 kezelést követően is, de sokkal szignifikánsabb foszforilálódás volt megfigyelhető kombinált alkalmazásuk esetén.

PACAP hatásai choriocarcinoma sejtek túlélésére methotrexate kezelés hatására

Vizsgálatainkban arra az eredményre jutottunk, hogy a PACAP1-38 vagy a PACAP6-38 kezelés önmagában nem változtatott a vizsgált sejtvonal túlélésén, MTX egyedüli alkalmazása esetén a túlélés körülbelül a felére csökkent le. A citosztatikum és PACAP1-38 vagy PACAP6-38 kombinált alkalmazása esetén ugyanezt a hatást kaptuk, tehát a peptid és az antagonista sem mutatott védő vagy toxikus hatást.

PACAP hatásai choriocarcinoma sejtek jelátviteli útvonalaira toxikus körülmények között

Eredményeink azt mutatják, hogy önmagában a PACAP38 kezelés nem változtat az ERK1/2 és a p38 MAPK foszforilációján, de csökkenti az Akt aktivációját. A PACAP-al

és H_2O_2 -dal történő együttes kezelést követően csökken a fenti jelátviteli útvonalak foszforilációja. Az Akt esetében a PACAP38 önmagában is csökkentette az aktivációt, így az együttes kezelést követően kialakuló csökkenés additív hatásnak minősül. Az ERK1/2 és a p38 MAPK esetében a PACAP38 önmagában nem csökkentette az aktivációt, így az együttes kezelés következtében kialakuló csökkenés ezekben az esetekben potencírozó hatásnak tudható be.

PACAP hatásai extravillosus cytotrophoblast (HIEC) sejtekre

Az immortalizált extravillosus cytotrophoblast sejtek esetében, azonos körülmények között ugyanúgy viselkedett a PACAP1-38 és a PACAP6-38, mint a tumoros choriocarcinoma sejtek esetében. A HIEC sejtek túlélésén sem változtatott a PACAP1-38 és PACAP6-38 kezelés önmagában, viszont a MTX szignifikánsan csökkentette a túlélést. A MTX ezen toxikus hatását ennél a sejtvonalnál sem tudta a PACAP1-38 kivédeni, vagy a PACAP6-38 erősíteni. A HIEC sejtek invázióját és proliferációját ezidáig PPAR γ hozzáadásával vizsgálták. A PACAP1-38-al és PACAP6-38-al ellentétben a PPAR γ nem fokozta a proliferációt, viszont a PPAR γ és a PACAP1-38 csökkentette az inváziós készséget, ebből arra következtethetünk, hogy ezen anyagok modulálják a cytotrophoblastok invázióját a placentában. Továbbra is érdekes kérdés marad azonban, hogy a PACAP6-38 a cytotrophoblastok esetében nem antagonistá hatású. Ezen eredmények tisztázására PCR kísérleteket végzünk egy esetleges új receptor feltérképezésére a placentában.

A PACAP általános sejtvédő hatásától eltérő hatásai egyes sejtekben

A PACAP-ot legtöbb esetben cytoprotektív hatása alapján jegyzik az irodalomban, ezt a tulajdonságát először neuronális sejtvonalon mutatták ki, ahol protektív hatást fejtett ki többféle toxikus stresszorral szemben. A PACAP38 többek között védő hatást fejt ki glutamát, etanol, ceramid, 6-hidroxidopamin, HIV burokfehérje, rotenon és hypoxia okozta károsodással szemben. A PACAP védő hatását cerebelláris szemcsesejtek esetében is kimutatták oxidatív stresszel szemben. Hasonló mértékű protektív hatást mutatott ki munkacsoportunk oxidatív stresszel szemben az endotél sejtek vagy szívizomsejtek esetében is. Jelen eredményeink ezzel teljesen ellentétben azt mutatják, hogy a PACAP nem segíti a trophoblast sejtek túlélését. A PACAP kezelés önmagában

nem változtatott a túlélési arányon, de fokozta az oxidatív stressz és *in vitro* hypoxia által okozott toxikus hatást. Ennek a potencírozó hatásnak az oka még ismeretlen.

Az irodalmi adatok azonban nem minden sejt esetében mutatnak sejttúlélést elősegítő hatást. Egyes esetekben a PACAP38 pont ellentétes hatást fejt ki, mégpedig gátolja a sejtek túlélését, mint pl. myeloma és humán leukémia sejtekben. Továbbá kimutatták, hogy a PACAP KO egerekben gyakrabban fejlődik ki colorectalis tumor. Kardiális fibrocitákban a PACAP gátolja a proliferációt és a fehérjeszintézist. Más esetekben pedig azt találták, hogy a PACAP, ellentétben a VIP-vel, nem befolyásolja a sejtek túlélését, mint pl. myentericus neuronkultúrában. Ennek hátterében az állhat, hogy a PACAP receptorok közül az adott sejtekben más splice variáns expresszálódik. További tényező lehet az az ismert tény, hogy különböző sejttypusokban egy ligand pleiotrop biológiai választ idézhet elő a szövet/sejtspecifikus szignáltranszdukciós útvonalak miatt. Különösen tumorsejtekben fordulhat elő, hogy a PACAP-nak egy másik receptortípusa jelenik meg, mely eltérő hatást közvetít, vagy a tumorsejtekben eltérő jelátviteli utak aktiválódnak. Ezen, a PACAP általános hatásaitól eltérő hatások lehetnek trophoblast specifikusak, vagy csak a tumoros trophoblast sejtekre jellemzőek. Ennek a kérdésnek a tisztázására kezdtünk kísérleteket immortalizált cytotrophoblastokkal illetve primer cytotrophoblast sejtvonallal. Ennek érdekében részt vettem egy külföldi kollaborációban (Laboratoire d'Hormonologie, Maternité, Hopitaux de Universitaire de Genève, Genf, Svájc), ahol placentából izoláltuk a primer cytotrophoblast sejteket. Ezen kísérletek még jelenleg is folynak.

PACAP által aktivált jelátviteli útvonalak

A PACAP-al kapcsolatban kimutatták már, hogy többféle jelátviteli útvonalat aktivál. Számos eredmény született arról, hogy a PACAP sejttúlélést elősegítő hatását több, a MAPK családba tartozó jelátviteli útvonal segítségével fejt ki. A PACAP stimulálja az általában antiapoptotikus hatással rendelkező ERK1/2 és gátolja a nagyrészt proapoptotikus JNK1/2 illetve p38 MAPK útvonalak aktivitását. Továbbá, a PACAP ellensúlyozza az ischemia-, oxidatív stressz-, vagy glutamát-indukálta változásokat ezeknél a szignáltranszdukciós molekuláknál. Kísérletünkben PACAP előkezelést követő oxidatív stressz és hypoxia hatására csökkent túlélési arányt találtunk. Western-

blot analízisünk során a PACAP sokféle hatását mutattuk ki. Egyértelmű volt, hogy egyes védő útvonalak (ERK1/2, Akt) aktivitása csökken, de a PACAP egyes proapoptotikus útvonalakat is visszaszorított. A p38 MAPK útvonal esetében, ami körülményektől függően lehet pro- illetve antiapoptotikus hatású is, hasonló aktivitáscsökkenést figyelhattunk meg mint a protektív faktorok esetében. Azt találtuk, hogy a PACAP potencírozó és additív hatással rendelkezik az általunk vizsgált jelátviteli útvonalak esetében, ha a sejtek oxidatív stressznek is ki voltak téve, amit a PACAP sejthalált elősegítő hatása is alátámaszt. Eredményeink értelmezéséhez a trophoblast sejtek további vizsgálata szükséges, melyek megmagyarázhatják az előbb említett mechanizmust és a lehetséges fiziológiás, illetve patofiziológiás folyamatokat, melyek felelőssé tehetőek a PACAP mediálta jelátviteli útvonalakért.

Kísérleteink további, általánostól eltérő eredménye, hogy a PACAP6-38 agonistaként viselkedett, mely nem csak ezen sejtvonalra érvényes, mivel munkacsoportunk kimutatta, hogy a PACAP6-38 a tracheában a felszabaduló gyulladáscsökkentő neuropeptidekre is a PACAP1-38-al agonista módon hat, és nem antagonistaként. Ezek a megfigyelések felvetik annak a lehetőségét, hogy ezekben a sejtekben/szövetekben a PACAP receptornak egy eddig ismeretlen splice variánsa található, melyen keresztül a PACAP6-38 ugyanolyan jelátviteli útvonalakat aktivál, mint a PACAP1-38. Ennek tisztázására további kísérletekre van szükség.

Új eredmények összefoglalása:

- Kimutattuk a PACAP38-at és PACAP27-et humán, érett placentából és 9 hetes abortumokból, ezen kívül, hogy a PACAP szintje emelkedik a terhesség előrehaladtával
- Kimutattuk a PACAP38-at humán tüszőfolyadékban.
- PACAP1-38 előkezelés szignifikánsan csökkentette a túlélést azon JAR sejteknél melyek oxidatív stressznek vagy hipoxiának ki voltak téve.

- Az ERK1/2 és JNK/SAPK jelátviteli útvonalak esetében a PACAP1-38 és PACAP6-38 kombinált kezelés növelte ezen útvonalak aktivációját, de csökkentette a p38MAPK foszforilációját.
- Sem a PACAP1-38, sem a PACAP6-38, sem kombinált alkalmazásuk nem fejtett ki antiapoptotikus hatást JAR sejteknel MTX kezelés következtében.
- A PACAP1-38-al és H₂O₂-dal történő együttes kezelést követően csökken a JAR sejtekben az ERK1/2 és a p38MAPK foszforilációja.
- A HIPEC sejtek túlélésén sem változtatott a PACAP1-38 és PACAP6-38 kezelés sem, illetve a MTX toxikus hatását sem volt képes kivédeni.
- PACAP1-38 a HIPEC sejtek inváziós készségét gátolta, proliferációját elősegítette. A PACAP6-38 a proliferációt szignifikáns mértékben fokozta.

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

Brubel R, Reglődi D, Jámbor É, Koppán M, Várnagy Á, Bíró Zs, Kiss P, Gaál V, Matkovits A, Farkas J, Lubics A, Bódis J, Bay Cs, Veszprémi B, Tamás A, Németh J, Márk L. Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry. *J Mass Spectr* 2011;46: 189-94 (IF: 3.411)

Brubel R, Boronkai Á, Reglődi D, Rácz B, Németh J, Kiss P, Lubics A, Tóth G, Horváth G, Varga T, Szőgyi D, Fónagy E, Farkas J, Barakonyi A, Bellyei Sz, Szereday L, Koppán M, Tamás A. Changes in the expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the human placenta during pregnancy and its effects on the survival of JAR choriocarcinoma cells. *J Mol Neurosci* 2010;42: 450-458. (IF: 2.72)

Boronkai Á, **Brubel R**, Rácz B, Tamás A, Kiss P, Horváth G, Lubics A, Szigeti A, Bellyei Sz, Tóth G, Lakatos A, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on the survival and signal transduction pathways in human choriocarcinoma cells. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1163: 353-357 (IF: 2.67)

Reglődi D, Börzsei R, Bagoly T, Boronkai Á, Rácz B, Tamás A, Kiss P, Horváth G, **Brubel R**, Németh J, Tóth G, Helyes Zs. Agonistic behavior of PACAP6-38 on sensory nerve terminals and cytotrophoblast cells. *J Mol Neurosci* 2008;36: 270-278. (IF: 2.061)

Egyéb közlemények:

Brubel R, Horváth G, Reglődi D, Lubics A, Tamás A, Kiss P, László E, Németh J, Márk L, Szakály P. Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor in the rat kidney. *Transplant Proc* 2011; 43: 1297-1299 (IF: 0,994)

Szakály P, László E, Kovács K, Rácz B, Horváth G, Ferencz A, Lubics A, Kiss P, Tamás A, **Brubel R**, Oppér B, Baba A, Hashimoto H, Farkas J, Matkovits A, Magyarlaki T, Helyes Zs, Reglődi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) show increased susceptibility to in vivo renal ischemia/reperfusion injury. *Neuropeptides*. 2011;45:113-21 (IF: 2.036)

Czeplédi L, Tamás A, Börzsei R, Bagoly T, Kiss P, Horváth G, **Brubel R**, Németh J, Szalontai B, Szabadfi K, Jávör A, Reglődi D, Helyes Zs. Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals. *Gen Comp Endocrinol*. 2011;172:115-9 (IF: 2.732)

Horváth G, Márk L, **Brubel R**, Szakály P, Rácz B, Kiss P, Tamás A, Helyes Zs, Lubics A, Hashimoto H, Baba A, Shintani N, Fürjes G, Németh J, Reglődi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide display increased sensitivity to renal oxidative stress in vitro. *Neurosci Lett* 2010;469: 70-74 (IF: 1.925)

Horváth G, **Brubel R**, Kovács K, Reglődi D, Oppert B, Ferencz A, Szakály P, László E, Hau L, Kiss P, Tamás A, Rácz B. Effects of PACAP on oxidative stress-induced cell death in rat kidney and human hepatocyte cells. J Mol Neurosci 2010;484(2):148-52. (IF: 2.72)

Horváth G, Reglődi D, Oppert B, **Brubel R**, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Csernus V, Matkovits A, Rácz B. Effects of PACAP on the oxidative stress-induced cell death in chicken pinealocytes is influenced by the phase of the circadian clock. Neurosci Lett 2010;484:148-152 (IF:1.925)

Tudományos közlemények összesített impact faktora: **23,194**

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Dr. Reglődi Dórának, Dr. Lubics Andreának és Dr. Tamás Andreának, akik támogatták és irányították tudományos tevékenységemet. Szeretném megköszönni intézetvezetőnknek, Dr. Csernus Valérnak, hogy támogatta tudományos munkámat.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Kiss Péternek a dolgozat szerkesztésében és ábraanyagának elkészítésében nyújtott segítségéért. Ezen kívül szeretnék köszönetet mondani Dr. Horváth Gabriellának és az Anatómiai Intézet összes dolgozójának.

Köszönet illeti Dr. Rácz Boglárkát, Dr. Márk Lászlót, Dr. Boronkai Árpádot és a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet munkatársait is a molekuláris biológiai és tömegspektrometriai kísérletek elsajátítása során nyújtott segítségért.

Ezen kívül szeretnék köszönetet mondani Dr. Koppán Miklósnak, Dr. Várnagy Ákosnak és Dr. Varga Tamásnak a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáról, illetve Dr. Szereday Lászlónak és Dr. Barakonyi Alíznek az Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetből a kísérletekhez szükséges minták gyűjtéséhez nyújtott segítségért.

***PRESENCE OF PACAP IN THE REPRODUCTIVE SYSTEM
AND ITS EFFECTS ON TROPHOBLAST CELL SURVIVAL
AND SIGNALING PATHWAYS***

PhD. thesis

Réka Brubel MD.

University of Pecs, Medical School

Department of Anatomy

Supervisors:

Dóra Reglódi MD., PhD.,DSc.

Andrea Lubics MD.,PhD.

Program leader:

Valér Csernus MD.,PhD.,DSc.

Introduction

Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)

Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) was originally isolated in 1989 from the hypothalamus, based on its cAMP-increasing effect in pituitary cells. It is a member of secretin/glucagon/vasoactive intestinal polypeptide family and shares 67% identity with VIP. PACAP occurs in two amino acid forms: PACAP38 and PACAP27, with the 38 amino acid form being predominant in human tissues. The peptide is degraded by dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV) and it has a very short half-life time in body fluids. During the degradation more N-terminal shorter peptides arise, which are biologically not active any more. The N-terminal end is necessary for the biological activity, but not for the receptor binding. These peptides, for example PACAP3-38, in most cases are antagonists. The most effective antagonist fragment is PACAP6-38.

Occurrence of PACAP in the body

PACAP occurs not only in the central and peripheral nervous system, but also in other tissues, like the adenohypophysis, suprarenal gland, endocrine pancreas, parathyroid gland, and in the cardiovascular, gastrointestinal and the urinary tract and respiratory system.

PACAP-receptors

The PACAP receptors belong to the family of G-protein coupled receptors with seven transmembrane domains. There are two types of PACAP receptors: PAC1 receptor which binds PACAP with high affinity and VIP with a much lower affinity and VPAC1 and VPAC2 receptors which bind VIP and PACAP with similar affinities. PAC1 receptors are localized in the central nervous system (different parts of the hypothalamus, cortex, thalamus, mesencephalon, pons and cerebellum), adenohypophysis, suprarenal gland and in the testis.

Effect of PACAP on the gonadal functions

Several studies have shown the role of PACAP not only in the regulation of pituitary hormone secretion but also in other reproductive functions. PACAP is present in the uterus, where it supposedly plays a role in muscle contraction and blood supply. Little is known about the effects of PACAP in the placenta. Both forms of the peptide, PACAP38 and PACAP27, along with their receptors, are present in the human pregnant uterus and placenta. PACAP causes a relaxation on stem villous and intramyometrial arteries, suggesting a vasoregulatory role in the uteroplacental unit. PACAP is suggested to play a role in decidualization and the time-related localization of endometrial-uterine PACAP is implicated in facilitation of endometrial blood flow and increase the availability of metabolic substrates to the developing deciduoma or embryo. PACAP is an important trophic factor during the embryonic development and also in the mature nervous system. Based on the currently available data it seems that the placenta synthesizes PACAP in addition to the numerous growth factors and hormones important for the development and maintenance of pregnancy and for the fetal development.

Molecular mechanism of the protective effects of PACAP

PAC1 receptor is responsible for the cytoprotective effects of PACAP. PAC1 receptor is coupled to adenylate cyclase and phospholipase C. Through adenylate cyclase activation, it elevates cAMP, and activates protein kinase A (PKA), which can, among others, activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the extracellular signal-regulated kinases (ERK) pathways and down-regulate the C-Jun N-terminal kinases (JNK) and the p38 MAPK.

The aims were the following:

- to determine the concentration of PACAP38 and PACAP27 in human first trimester and full-term placentas (maternal central and peripheral; fetal central and peripheral) and in the umbilical cord.
- to determine, by means of mass spectrometry, whether PACAP is present in different samples from the human reproductive organs.
- to investigate the effects of PACAP on the survival and signaling pathways in JAR (human choriocarcinoma) cytotrophoblast cells exposed to cellular stressors such as H₂O₂, CoCl₂, lipopolysaccharide and ethanol induced *in vitro* hypoxia and after cytostatic treatment.
- to investigate the effects of PACAP1-38 and PACAP6-38 on the cell viability of HIPEC65 (human invasive proliferative extravillous cytotrophoblast) cells exposed to cytostatic treatment and on invasion-proliferation.

Materials and Methods

Occurrence of PACAP in the human placenta

Human placentas were collected from aborted (9 weeks, n=7) and full-term placentas (n=6). Samples were taken from the chorionic villi (fetal side) and from the decidua (maternal side). In case of full-term births, samples from the umbilical cord were also collected (n=6). Tissue samples were weighed and homogenized in ice-cold distilled water. The homogenate was centrifuged (12,000 rpm, 4 °C, 30 min) and the supernatant was further processed for radioimmunoassay (RIA) analysis of PACAP38 and PACAP27 content, as previously described.

Radioimmunoassay

Follicular fluid was collected as described above. The samples were weighed and centrifuged (12,000 rpm, 4°C, 30 min), and supernatant was further processed for RIA

analysis of PACAP38-like immunoreactivity, as previously described. Briefly, the conditions were as follows: antiserum: PACAP38: “88111-3” (working dilution 1:10,000), tracer: mono-¹²⁵I-labelled ovine PACAP24-38 prepared in our laboratory (5,000 cpm/tube), standard: ovine PACAP38 were used as a RIA standard ranging from 0 to 1000 fmol/ml, buffer: the assay was prepared in 1 ml 0.05 mol/l (pH 7.4) phosphate buffer containing 0.1 mol/l sodium chloride, 0.25 % (w/v) BSA and 0.05 % (w/v) sodium azide. Incubation time: 48-72 h incubation at 4 °C. Separation solution: charcoal/dextran/milk powder (10:1:0.5 g in 100 ml distilled water).

Mass spectrometry analyses

Human biological samples were collected according to a protocol approved by the institutional ethic committee (3117/2008, 3610/2009), during ophthalmological surgery or routine gynecological examinations, without extra intervention. Patients provided written approval of the sample collection in all cases. The samples were further processed for mass spectrometry analysis based on modifications of earlier descriptions. The peptidase inhibitor aprotinin was added to all samples (30 µl/ml), except for the cervico-vaginal fluid, nasal fluid and saliva on filter paper.

Follicular fluid was collected from female volunteers (age between 20-35, n=40) by follicular puncture after controlled ovarian hyperstimulation during the in vitro fertilization procedure.

Amniotic fluid specimens were collected at the 16th week of gestation from volunteering pregnant females undergoing amniocentesis as a prenatal diagnostic tool due to maternal age (age over 35 years, n=25).

Cervico-vaginal fluid samples were collected from female volunteers in the progesterone phase of the cycle (age between 25-35, n=10) by application of sterile filter paper strips (Schirmer paper) during colposcopic examination. Human nasal fluid (age between 20-40, n=10) and saliva (age between 20-40, n=10) were also collected by application of sterile filter paper strips (Schirmer paper) from healthy volunteers.

Human aqueous humor was collected from volunteers (age between 60-85 n=10) during cataract surgery. A 100 µl of the follicular fluid sample was centrifuged at 10,000 rpm for

5 min, followed by addition of 10 μ l 72% trichloroacetic acid and 100 μ l H₂O₂ to 90 μ l supernatant. The samples were centrifuged at 13,000 rpm for 10 min after precipitation. The amniotic fluid (200 μ l) was centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. The supernatant (100 μ l) was acidified by 100 μ l 1% trifluoroacetic acid (TFA) and then centrifuged at 13,000 rpm for 10 min.

The solutions from the above described samples were desalted and cleaned using 0.1% TFA solution with ZipTip₁₈ pipette tips (Millipore Kft., Hungary). The purified proteins and peptides were eluted directly onto the MALDI target plate (MTP 384 massive target T, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) by 3 μ l of acetonitrile/0.1 % TFA (50/50, v/v) solution by mixing 1 μ l of a saturated matrix solution, prepared freshly every day by dissolving α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in acetonitrile/0.1% TFA (1/2, v/v).

The cervico-vaginal fluid, human nasal fluid and saliva were dissolved by using 100 μ l of acetonitrile-0.1% TFA (5/95, v/v) mixture in an ultrasonic bath at 5 min. The samples, including the human aqueous humor were loaded onto the target plate (MTP 384 massive target T, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) directly by mixing 1-1 μ l of each solution with the same volume of a saturated matrix solution, prepared freshly every day by dissolving α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in acetonitrile/0.1% TFA (1/2, v/v).

Identification of PACAP38 was performed with matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight (MALDI TOF/TOF) mass spectrometry. Briefly, the mass spectrometer used in this work was an Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics) operated in the linear detector for MALDI TOF or LIFT mode for high energy collision induced decay MALDI TOF/TOF with an automated mode using the FlexControl software. The ions were accelerated under delayed extraction conditions (200 ns) in positive ion mode with an acceleration voltage of 20.00 kV. The instrument uses a 337 nm pulsed nitrogen laser, model MNL-205MC (LTB Lasertechnik Berlin GmbH., Berlen, Germany). External calibration was performed in each case using Bruker Peptide Calibration Standard (#206195 Peptide Calibration Standard, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Protein masses were acquired with a range of m/z 1,000 to m/z 10,000. Each spectrum was preceded by accumulating data from 200 consecutive laser shots for standard PACAP38 solution and 1,000 for amniotic-, follicular-, cervico-vaginal-, nasal fluid, saliva and aqueous humor samples. The Bruker FlexControl 2.4

software was used to operate the instrument and the Bruker Flexanalysis 2.4 software for spectrum evaluation.

Cell culture

JAR human choriocarcinoma cells were from the American Type Culture Collection (Wesel, Germany). The cells were maintained as monolayer adherent culture in RPMI-1640 medium containing 1% antibiotic-antimycotic solution, 1% pyruvate solution (100 nM) and 10% fetal calf serum (FCS, Sigma, Hungary) in a humidified 95% air and 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. HIPEC 65 cells are extravillous cytotrophoblast cells, they were cultured in DMEM medium.

Cell viability test

JAR CELLS

Viability of JAR cells was determined by colorimetric MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, Hungary). The assay is based on the reduction of MTT into a blue formazan dye by functional mitochondria of viable cells. The cells were seeded into 96-well plates at a density of 10⁴ cell/well and cultured overnight before the experiment.

A., Effect of PACAP38 on JAR cells in case of several toxic agents

JAR cells were randomly assigned to one of the 12 experimental groups. 1.) a.) Control group of cells were incubated in RPMI (normal medium, Sigma, Hungary) without treatment. 1.) b.) 100 nM PACAP1-38, 2.) a.) 0.45 mM H₂O₂, b.) pretreatment with 100 nM PACAP38 followed by 0.45 mM H₂O₂, 3.) a.) 0.9 mM H₂O₂, b.) 100 nM PACAP38 pretreatment followed by 0.9 mM H₂O₂, 4.) a.) 75 µM CoCl₂, b.) pretreatment with 100 nM PACAP38 and followed by 75 µM CoCl₂, 5.) a.) 1 µg/ml lipopolysaccharide (LPS), b.) 100 nM PACAP38 pretreatment, followed by 1 µg/ml lipopolysaccharide, 6.) a.) 200 mM ethanol, b.) pretreatment with 100 nM PACAP38 followed by 200 mM ethanol.

Control cells were not treated previously with PACAP38. Other groups of cells were pretreated with PACAP38 for 1 hour, and then exposed to different toxic agents for 9 hours.

B., Effect of PACAP38 on JAR cells exposed to chemotherapeutic agent

JAR cells were randomly assigned to one of the 24 experimental groups. Control group of cells were incubated in RPMI (normal medium, Sigma, Hungary) without treatment (group 1). Other groups were incubated in RPMI medium containing PACAP1-38 in the presence or absence of the PACAP receptor antagonist and/or methotrexate (MTX) (groups 5-12 and 17-24). Detailed treatment groups: (2): 100 nM PACAP1-38; (3) 1 μ M PACAP6-38; (4) 100 nM PACAP1-38 and 1 μ M PACAP6-38; (5) 10 μ M MTX; (6) 100 nM PACAP1-38 pretreatment for 1 hour followed by 10 μ M MTX; (7) pretreatment with 1 μ M PACAP6-38 for 1 hour followed by 10 μ M MTX; (8) 100 nM PACAP1-38 and 1 μ M PACAP6-38 as pretreatment for 1 hour followed by 10 μ M MTX; (9) 100 μ M MTX; (10) 100 nM PACAP1-38 as pretreatment for 1 hour followed by 100 μ M MTX; (11) 1 μ M PACAP6-38 for 1 hour followed by 100 μ M methotrexate; (12) 100 nM PACAP1-38 and 1 μ M PACAP6-38 for 1 hour followed by 100 μ M MTX; (13) control group; (14) 1 nM PACAP1-38; (15) 100 nM PACAP6-38; (16) 1 nM PACAP1-38 and 100 nM PACAP6-38; (17) 10 μ M MTX; (18) 1 nM PACAP1-38 for 1 hour followed by 10 μ M MTX; (19) 1 μ M PACAP6-38 for 1 hour followed by 10 μ M MTX; (20) 1 nM PACAP1-38 and 100 nM PACAP6-38 for 1 hour followed by 10 μ M MTX; (21) 100 μ M MTX; (22) pretreatment with 1 nM PACAP1-38 for 1 hour followed by 100 μ M MTX; (23) 100 nM PACAP6-38 for 1 hour followed by 100 μ M MTX; (24) 1 nM PACAP1-38 and 100 nM PACAP6-38 for 1 hour followed by 100 μ M MTX. PACAP1-38 was synthesized as previously described. Cells were exposed to the mentioned concentrations of chemicals for 48 hrs. Evaluation of cell survival was performed immediately after termination of treatments. Experiments were repeated six times. The selected dose of MTX was based on our preliminary studies showing significant cell death with this concentration in JAR cells. The dose of PACAP was based on in vitro studies using PACAP as a protective agent against various toxic effects, where the range of 10-100 nM was proven to be the

most effective. After 48 hours of treatment, the medium was removed, and fresh RPMI/FCS containing 0.5% of the water-soluble yellow mitochondrial dye MTT was added.

Cells were then incubated for 3 hours at 37 °C in an atmosphere of 5 % CO₂. After 3 hours of incubation the medium was removed, and the water-insoluble blue formazan dye formed stoichiometrically from MTT+ was solubilized by acidic isopropanol (Sigma, Hungary). Optical densities were determined by an ELISA reader (Anthos Labtech 2010; Vienna, Austria) at the wavelength of 550 nm representing the values in arbitrary unit (AU). All experiments were run at least four parallels and repeated six times. Results are expressed as percentage of control values.

HIPEC CELLS

Viability of HIPEC cells was determined by colorimetric WST-1 assay. The cells were seeded into 96-well plates at a density of 10⁴ cell/well and cultured in DMEM medium overnight before the experiment.

JAR cells were randomly assigned to one of the 24 experimental groups. 1.) Control group of cells were incubated in DMEM medium. 2.) 100 nM PACAP1-38 3.) 1 µM PACAP6-38, 4.) 10 µM MTX, 5.) pretreatment with 100 nM PACAP1-38 followed by 10 µM MTX, 6.) pretreated with 1 µM PACAP6-38 followed by 10 µM MTX.

Control cells were not treated previously with PACAP1-38 or PACAP6-38, but in that case, where the cells were exposed to cytostaticum for 48 hours, they were pretreated with PACAP1-38 or PACAP6-38 for 1 hour. After 48 hours of treatment, the medium was removed, and fresh DMEM/FCS containing 0.5% of the water-soluble WST-1 solution was added. Cells were then incubated for 3 hours at 37 °C in an atmosphere of 5 % CO₂. After 3 hours of incubation optical densities were determined by an ELISA reader (Anthos Labtech 2010; Vienna, Austria) at the wavelength of 550 nm representing the values in arbitrary unit (AU). All experiments were run at least four parallels and repeated six times. Results are expressed as percentage of control values.

Invasion and proliferation assay

Cells invasion assay was performed in an invasion chamber based on the Boyden chamber principle. Each insert is fitted with an 8- μ m pore size polycarbonate membrane. The membrane filter of inserts were coated with rat tail collagen I (5 μ g/cm²). After the inserts were washed in DMEM medium and incubated for 30 minutes at room temperature. For each well, we added 5 x 10⁵ HIPEC cells in 100 μ L of serum-free media to the upper compartment of the transwell chambers. We also added 5 x 10⁵ HIPEC cells respectively, in 400 μ L of serum-free media to the lower chamber. We incubated the cells for 72 hours at 37 °C in an atmosphere of 5 % CO₂ incubator. After incubation, we discard the supernatant and stain the viable cells that invaded collagen with 400 μ L of crystal violet cell stain during 20 minutes at room temperature. Then we rinsed the cells several times in water and while the insert was still moist, we removed non-invading cells from the insert using a cotton-tipped swab. After we transferred the stained insert to a clean well containing 200 μ L of a solution of H₂O:ethanol:acetic acid (49:50:1) for 20 minutes at room temperature. Then we transferred 100 μ L of the dye mixture to a 96-well microtiter plate for colorimetric measurement at 560 nm. Express data as the percentage of invading cells relative to the untreated (control: cultured alone) cells.

Western-blot

The JAR cells were seeded into 6-well plates at the starting density of 5 x 10⁵ cells/ml.

A.)Effect of PACAP1-38 and PACAP6-38 on JAR cells

JAR cells were randomly assigned to one of the 4 experimental groups. 1.) control group, 2.) 1 hour treatment with 100 nM PACAP38, 3.) 1 hour treatment with 1 μ M PACAP6-38, 4.) 1 treatment with 100 nM PACAP38 and 1 μ M PACAP6-38.

B.) Effect of PACAP1-38 on JAR cells exposed to H₂O₂

JAR cells were randomly assigned to one of the 4 experimental groups. 1.) control group, 2.) cells were exposed to 0.6 mM H₂O₂ for 9 hours, 3.) cells were exposed to 0.6 mM

H₂O₂ for 9 hours following to 1 hour pretreatment with 100 nM PACAP1, 4.) 1 hour treatment with 100 nM PACAP38.

The control groups remained without PACAP1-38 exposition. After exposition the cells were harvested in ice-cold lysis buffer containing the phosphatase inhibitor Na₃VO₄ (0.5 mM) and protease inhibitor cocktail in PBS. The cells were disrupted by sonication and centrifuged at 10,000 x g for 15 min. Protein contents of the supernatant fractions were measured using the BioRad assay and the protein concentration of the samples were equalized. Even loads (10 µg each) of cell extracts were separated on 8, 12 or 15 % sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membrane, and were probed with rabbit polyclonal or mouse monoclonal IgGs (Cell Signaling Technology Inc, Beverly, Massachusetts, USA) against the following antigens: protein kinase B (Akt), phospho-protein kinase B, (P-Akt, Ser473), phospho-p44/42 mitogen activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase-1/2, (P-ERK1/2, Thr202/Tyr204), phospho-stress activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (P-JNK, Thr183/Thr185), phospho-p38-mitogen activated protein kinase (P-p38-MAPK, Thr180/Tyr182). Horseradish peroxidase labelled anti-rabbit and anti-mouse IgG were used as secondary antibodies. Protein bands were visualized by the ECL chemiluminescence system (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Results were demonstrated by representative blots of at least three experiments.

Flow Cytometry

The JAR cells were seeded into 6-well plates at the starting density of 10⁵ cells/2ml/well. JAR cells were assigned to 6 experimental groups: 1.) control group without treatment, 2.) 100 nM PACAP1-38, 3.) 10 µM MTX, 4.) 100 µM MTX, 5.) 100 nM PACAP1-38 and 10 µM MTX, 6.) 100 nM PACAP1-38 and 100 µM MTX.

The HIPEC cells were also seeded into 6-well plates at the starting density of 10⁵ cells/2ml/well. HIPEC cells were assigned to 6 experimental groups: 1.) control group

without treatment, 2.) 100 nM PACAP1-38, 3.) 1 μ M PACAP6-38, 4.) 10 μ M MTX, 5.) 100 nM PACAP1-38 and 10 μ M MTX, 6.) 1 μ M PACAP6-38 and 10 μ M MTX.

Annexin V and propidium iodide staining were used to detect apoptosis and necrosis in JAR cells. In the early stages of apoptosis, cells typically have an intact cell membrane. Thus, they are not stained with propidium iodide, whereas externalization of phosphatidylserine can be detected by annexin V. In the late phase of apoptosis, cells are stained with both dyes. Ratio of apoptosis was evaluated after double staining with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled annexin V (BD Biosciences, Hungary) and propidium iodide (BD Biosciences, Hungary) using flow cytometry. First, the medium was discarded and the wells were washed twice with isotonic sodium chloride solution. JAR cells were removed from the plates using a mixture of 0.25 % trypsin (Sigma, Hungary), 0.2 % ethylene-diamin tetra-acetate (EDTA; Serva, Hungary), 0.296 % sodium citrate, 0.6 % sodium chloride in distilled water. This medium was applied for 15 min at 37 °C. Removed JAR cells were washed twice in cold PBS and were resuspended in binding buffer containing 10 mM Hepes NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂. Cell-count was determined in Burker's chamber for achieving a dilution in which 1 ml of solution contains 10⁶ cells. One hundred microliters of buffer (10⁵ cells) was transferred into 5 ml round-bottom polystyrene tubes. Cells were incubated for 15 min with fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated annexin V molecules and propidium iodide (PI). After this period of incubation, 400 μ l of annexin-binding buffer (BD Biosciences, Hungary) was added to the tubes as described by the manufacturers. The samples were immediately measured by BD FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, USA). Results were analyzed by Cellquest software (BD Biosciences, USA). Quadrant dot plot was introduced to identify living and necrotic cells and cells in early or late phase of apoptosis, according to previous descriptions. Necrotic cells were identified as single PI-positive. Apoptotic cells were branded as annexin V-FITC-positive only and cells in late apoptosis were recognized as double-positive for annexin V-FITC and PI. Cells in each category were expressed as percentage of the total number of stained cells counted.

Statistical analysis

Data were presented as mean \pm S.E.M. from three independent experiments, analyzed with one-way ANOVA followed by Neumann-Keul's *post hoc* analysis, and were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Occurrence of PACAP in the human placenta

The presence of both PACAP38 and PACAP27 could be detected in the placentas using RIA. PACAP38 had significantly higher concentrations in every part of the full-term placenta, with a slightly higher concentration in the chorionic villi. The level of both peptides was very low in the umbilical cord, but concentration of PACAP38 was significantly higher than that of PACAP27 also in the umbilical cord. Both forms of PACAP could be measured in both the maternal and fetal parts of the placenta already at 9 weeks (in the aborted placentas). The levels of PACAP27 showed a significant increase on the maternal side toward the terminus, but not on the fetal side. Levels of PACAP38 significantly increased in both parts.

Mass spectrometry analyses

The sample preparation procedure optimized for each biological fluid was suitable for measuring and identifying low molecular weight peptides by mass spectrometry. Based on our previous and current results, sensitive and reproducible identification of PACAP38 can be carried out using linear MALDI TOF MS. The characteristic peak of PACAP38 is 4534.6 Da, as verified in the PACAP standard solutions. Mass spectrometry analysis revealed that PACAP38 was present in all of the stimulated ovarian follicular fluid samples. The collision induced decay MALDI TOF/TOF fragmentation of PACAP38 standard yielded mainly y fragment ions of the PACAP38 parent ion (4535 kDa). On the contrary, mass spectrometry results could not prove the presence of the

unmodified PACAP38 in any of the amniotic fluid, cervico-vaginal fluid, nasal fluid, human saliva or aqueous humor samples.

Effect of PACAP on choriocarcinoma cells

A., Effect of PACAP38 on JAR sells in case of several toxic agents

PACAP treatment alone did not influence the survival rate of JAR cells. Surprisingly, no protective effect was seen when cells were exposed to different concentrations of H₂O₂ after incubation with PACAP. On the contrary, cells exposed both to oxidative stress and PACAP showed a decreased survival rate, which was more robust in cells exposed to higher H₂O₂ concentration. A similar effect was observed in cells undergoing chemically induced hypoxia. PACAP treatment significantly reduced survival rate of cells exposed to CoCl₂. PACAP treatment did not have significant influence on the survival of cells exposed to LPS or ethanol.

B., Effect of PACAP38 on JAR cells exposed to cytostatic agent

To establish whether PACAP influences viability of cells exposed to MTX, mitochondrial viability in JAR cells was measured by MTT assay. Administration of MTX alone resulted in manifest decrease in cell viability compared to control values, with no difference between the two applied doses. Treatment with PACAP1-38 and PACAP6-38 alone did not alter cell viability. Co-incubation with PACAP1-38 and/or PACAP6-38 did not significantly affect cell viability compared to that of the control MTX-treated cells. It was observed with both PACAP1-38 and PACAP6-38 doses.

Effects of PACAP on the cell survival of HIPEC cells

PACAP1-38 or PACAP6-38 treatment alone did not influence the survival rate of HIPEC cells. Co-incubation with PACAP1-38 and/or PACAP6-38 did not affect cell viability compared to that of the control MTX-treated cells.

Effect of PACAP on the invasion and proliferation of HIPEC cellsThe invasion of the HIPEC cells was decreased by PACAP1-38, but it increased the proliferation. PACAP6-38 did not influence the invasion, but it significantly increased the proliferation.

Effect of PACAP on the cell signalling pathways of JAR cells

A.) Effect of PACAP1-38 and PACAP6-38 on Jar cells

ERK1/2

The active, phosphorylated form of ERK1/2 could be detected in control cells. The phosphorylation of ERK1/2 showed a slight increase after the administration of PACAP1-38. Interestingly, a similar, but more expressed increase in intensity was observed after the administration of a 10-fold higher concentration of PACAP6-38, and a similar increase was observed when both PACAP1-38 and PACAP6-38 were present.

p38 MAPK

Activation of p38 MAPK showed the opposite pattern as that of ERK1/2. Phosphorylation of p38 MAPK decreased in the presence of PACAP1-38, which was even more expressed when cells were incubated with PACAP6-38. In case of co-application of PACAP1-38 and PACAP6-38, the phosphorylation of p38 MAPK showed a marked further decrease.

JNK/SAPK

Phosphorylation of JNK/SAPK was only slightly detected in control cells with no treatments. Phosphorylation of JNK/SAPK showed an increase in the presence of PACAP1-38 alone, a stronger increase was observed in the presence of PACAP6-38 alone and an even more expressed increase was seen when both PACAP1-38 and PACAP6-38 were present. Our results show that PACAP6-38 did not behave as an

antagonist, but it had similar effects to PACAP1-38 on the MAP kinases in choriocarcinoma cells.

B.) Effect of PACAP1-38 on JAR cells exposed to H₂O₂

Akt

Initially, the total amount of Akt was examined, and no differences were found between any of the groups. The active form of Akt (phospho-Akt) was present in control cells, the amount of which was considerably lower if cells were exposed to PACAP1-38. The same effect was observed in case of oxidative stress alone. When cells were exposed to oxidative stress and PACAP, the activation of this well known protective pathway was extremely suppressed.

ERK1/2

Phosphorylation of ERK1/2 showed a slight increase after the administration of PACAP1-38, but the decreased phosphorylation of ERK1/2 after H₂O₂ was further decreased after simultaneous treatment with PACAP.

p38 MAPK

Activation of p38-MAPK showed the same pattern as that of Akt. Phosphorylation of p38 decreased in the presence of PACAP alone. In case of co-application of H₂O₂ and PACAP1-38, the phosphorylation of p38 showed a marked further decrease.

Investigation of apoptosis in JAR cells

Using this method, we found that the control group had more than 93% of intact, living cells and only less than 7% of cells in the apoptosis. PACAP1-38 administration alone caused no changes in the percentage of living, necrotic and apoptotic cells compared to control values. An increase of apoptotic and necrotic cells was observed in the MTX-treated group with a lower number of living cells. PACAP and MTX co-incubation

caused no significant changes in the percentage of living cells, necrotic and apoptotic cells compared to the cells treated with MTX alone.

Investigation of apoptosis in JAR cells

PACAP1-38 or PACAP6-38 administration alone caused no changes in the percentage of living, necrotic and apoptotic cells compared to control values. We found an increase of apoptotic and necrotic cells in the MTX-treated group. PACAP1-38 or PACAP6-38 and MTX co-incubation caused no significant changes in the percentage of living cells, necrotic and apoptotic cells compared to the cells treated with MTX alone.

Discussion

Occurrence of PACAP in the human placenta

In the present study we found high levels of PACAP38 and lower levels of PACAP27 in different parts of the full-term human placenta. The difference between the two forms of the peptide found in our study is in accordance with previous observations in the placenta. The concentration range of PACAP measured in the placenta is close to the range found in the brain, where the levels of PACAP are the highest. Our results also show that PACAP content increases during pregnancy in the placenta, both in the maternal and the fetal side. This is in accordance with earlier studies showing that PACAP mRNA and PAC1 receptor mRNA increases as gestation advances. In the rat, PACAP and PAC1 receptor mRNAs are expressed in decidual cells, chorionic vessels and stromal cells of the villi, with decreased expression mRNAs in the decidua and strong upregulation in the chorionic villi with advanced gestational age. A similar temporal and spatial distribution has been described in the human placenta. Our results also show that placental PACAP immunoreactivity is much stronger in later gestational age, although we found it in all parts of the placenta.

The high concentrations of PACAP imply that the peptide plays an important role in the placenta, which is further supported by the decreased fertility in mice lacking PACAP or PAC1 receptors, most probably due to impaired implantation in PACAP knockout mice.

Also, the expression of PACAP shows alteration during pregnancy in the cervix and spinal cord and a temporal relationship has been demonstrated between endometrial PACAP expression and proliferation of the deciduoma during decidualization and gestation.

Mass spectrometry analyses

In this study, we found the presence of PACAP38 in ovarian follicular fluid, obtained from forty stimulated female patients. Here, all of the samples contained PACAP38. The follicular fluid serves as a culture medium for the developing oocyte, and it is important for the morphological and functional integrity for the germ cell development. PACAP has been shown to have several functions in follicular development. PACAP is expressed stage-specifically in granulosa cells of large mature follicles before ovulation, but weaker expression has also been shown in the wall of immature antral and pre-antral follicles. PACAP receptors have also been demonstrated in developing follicles. Both PACAP and PAC1 receptor have been demonstrated in the corpus luteum. The PACAP found in the follicular fluid may derive from granulosa and/or theca cells. The peptide is thought to play a role in primordial germ cell proliferation, cyclic recruitment of immature follicles, follicular apoptosis, meiotic maturation of the oocytes and ovarian hormone and enzyme production. The finding that PACAP occurs in all of the ovarian follicular fluid samples indicates an important biological role for PACAP in this culture medium for the developing oocytes, the exact determination of which awaits further investigation.

In amniotic-, cervico-vaginal-, nasal fluid, saliva and in the aqueous humor we could not detect unmodified PACAP38 by mass spectrometry. This could possibly be due either to the complete lack of PACAP in the samples, or levels below detection limit. The rapid digestion can be excluded as explanation, since we added peptidase inhibitor to the samples. It is also conceivable that in some samples PACAP, or its fragments, would occur in a modified form, the determination of which would require further experiments. Another possibility is that the different biological fluids exhibit different qualitative and quantitative composition. This could also be reflected in suppression effects, which is often observed in MALDI spectra of complex protein-peptide mixtures. The lack of PACAP found in the present study does not necessarily exclude the possibility that

PACAP could be found under pathological circumstances. However, based on the present findings, we can conclude that under physiological circumstances PACAP, in its original form, is not present in the amniotic-, cervico-, vaginal-, nasal fluid, saliva or in the aqueous humor.

Effect of PACAP on the cell survival and signalling pathways of JAR cells

Effect of PACAP1-38 on JAR cells exposed to different harmful stimuli

The present study described various effects of PACAP1-38 on survival and signal transduction in JAR choriocarcinoma cells. It was found that 1 hour pretreatment with PACAP1-38 did not significantly influence the survival of trophoblast cells. However, the survival rate of cells exposed to oxidative stress and in vitro hypoxia showed a significant further decrease in PACAP-treated cells, implying that PACAP1-38 sensitizes the cells to these stressors. This was not observed in case of LPS or ethanol and MTX treatment.

Effect of PACAP1-38 or PACAP6-38 on JAR cells

Our present data show that PACAP1-38 treatment alone did not influence the phosphorylation of ERK1/2 and p38MAPK. In case of ERK1/2, PACAP6-38 treatment significantly increased the activation of this pathway and the same effect was observed following combination treatment. Opposite effect was found in case of p38MAPK, where PACAP1-38 and PACAP6-38 combination treatment lead to a significant decrease in phosphorylation. In JNK/SAPK pathway, PACAP1-38 treatment significantly increased activation which was also found following PACAP6-38 treatment. More significant phosphorylation was found after combination treatment.

Effects of PACAP on cell survival on JAR cells following MTX treatment

We found that neither PACAP1-38 nor PACAP6-38 altered the survival of the cell line. MTX alone decreased survival by approximately 50%. The same results could be obtained in case of combination treatment of MTX and PACAP1-38 or PACAP6-38. It suggests that the peptide or its antagonist does not have either protective or toxic effect.

Effects of PACAP of cell signaling pathways of JAR cells exposed to toxic agents

Our results showed that PACAP38 did not alter phosphorylation of ERK1/2 and p38MAPK, but decreased Akt activation. Combination of H₂O₂ and PACAP38 resulted in a decreased phosphorylation of these pathways. In case of Akt PACAP38 alone could also decrease activation, so the decreased activation found in combination treatment is an additive effect. PACAP38 alone could not decrease the activation of ERK1/2 and p38MAPK, suggesting that the decrease found in combination treatment is due to a potentiating effect.

Effects of PACAP on HIPEC cells

Under the same circumstances PACAP1-38 and PACAP6-38 had the same effect on immortalized extravillous cytotrophoblast cells as in tumorous choriocarcinoma cells. Survival of HIPEC cells was not influenced by PACAP1-38 or PACAP6-38 treatment alone, while MTX significantly decreased survival. These toxic effects of MTX could not be prevented or potentiated by PACAP1-38 or PACAP6-38. Invasion and proliferation of the HIPEC cells was previously observed with the administration of PPAR γ . In contrast to PACAP1-38 and PACAP6-38 PPAR γ did not increase proliferation but PPAR γ and PACAP1-38 decreased invasion, which implies that these compounds modulate cytotrophoblast invasion in the placenta. It still remains an interesting question why PACAP6-38 does not act as antagonist on cytotrophoblast cells. We plan to perform PCR experiments to explore a potential new type of receptor in placenta.

Different, non-protecting effects of PACAP on various cell lines

PACAP is generally described as a cytoprotective agent. This effect was first shown in neuronal cells exposed to different toxic agents. Among others, PACAP exerts neuroprotection in vitro against toxicity induced by glutamate, ethanol, ceramide, 6-hydroxydopamine, HIV envelope protein, rotenone, hypoxia and nitric oxide. The protective effects of PACAP in cerebellar granule cells have also been shown against oxidative stress. Similar degree of protection against oxidative stress has been found in other cell types, such as endothelial cells and cardiomyocytes. In spite of the vast

majority of data showing the neuroprotective effects of PACAP, this effect may be related to cell types, possibly expressing different splice variants of the receptors. No protective effect has been described in cultured rat myenteric neurons.

Similarly, different effects can be observed depending on the mechanism of toxicity, as it has been described in cerebellar granule cells against beta-amyloid (25-35)-induced apoptosis, where PACAP failed to protect against cell death. Based on our present data, PACAP does not enhance survival of trophoblast cells. PACAP alone did not influence survival rate, however, it enhanced the effects of oxidative stress and in vitro hypoxia. The reason for this sensitizing effect is not known. A recent study has shown that the PACAP-induced cAMP formation was significantly reduced in neuronal cells and astrocytes exposed to in vitro hypoxia.

The effects of PACAP on the survival of non-neuronal tumor cells are also divergent. Most studies show that PACAP enhances survival not only of normal cell types but it stimulates proliferation and promotes survival of cancerous cells. This has been shown in colonic tumor cells, lung cancer cells and a prostate cancer cell line. In contrast, PACAP suppresses the growth of myeloma cell line, a myeloid leukemic cell line and PACAP KO mice develop colorectal tumors more frequently. Our present results show that PACAP suppresses the survival of choriocarcinoma cells exposed to H₂O₂ toxicity and chemically induced hypoxia. Whether these effects are specific to trophoblast cells, or show tumor-dependent effects (choriocarcinoma), requires further investigation.

PACAP mediated signal transduction pathways

PACAP has been shown to influence multiple signal transduction pathways. The involvement of various members of the MAPK family in the PACAP-mediated actions on cell survival has been shown earlier. PACAP stimulates the production of the generally anti-apoptotic ERK1/2, and inhibits the production of the generally pro-apoptotic JNK1/2 and p38 MAPK. PACAP has also been shown to counteract the ischemia-, oxidative stress- or glutamate-induced changes in these signaling molecules. The present results show that PACAP acts partly differently on trophoblast cells. Although the phosphorylation of ERK1/2 was slightly increased after PACAP treatment alone, the decreased phosphorylation of ERK1/2 after H₂O₂ was further decreased after

simultaneous treatment with the peptide. The observed changes in p38 MAPK activity were in accordance with previous findings showing that the oxidative stress-induced elevations can be reduced by PACAP. JNK was also activated by the PACAP alone, but the H₂O₂ toxicity-induced elevation was reduced. In the present study a decrease in cell survival could be observed following oxidative stress or hypoxia if PACAP1-38 pretreatment was applied. Based on Western-blot results, the effects of PACAP were divergent. Attenuation of protective mechanisms (ERK-1/2 activation, Akt and GSK-3 β phosphorylation) was evident, but PACAP also attenuated some of the pro-apoptotic pathways. Concerning SAPK/JNK and p38 MAPK, members of the MAPK family which can act either as proapoptotic or anti-apoptotic mediators in different stages, the same inactivation occurred as in case of protective factors. The overall effect seems to be a sensitizing effect in almost all examined pathways when oxidative stress was applied, which may explain the enhancing effect of PACAP on cell death. PACAP signaling has been shown to be cell-specific depending on the expressed receptor splice variant, PACAP concentration and other factors. Based on these observations, PACAP is suggested to promote adaptation to stress and coordinate diverse environmental signals influencing cell survival under different circumstances both during developing and in mature tissues. Our present results should lead to further experiments on trophoblast cells to elucidate the mechanism and the possible physiological and pathophysiological significance of PACAP-mediated signaling in trophoblast cells and choriocarcinoma.

Summary of new findings

- We detected both PACAP38 and PACAP27 in the human full-term placenta and in 9 weeks abortions. Levels of PACAP38 significantly increased toward the terminus.
- We detected PACAP38 in the human follicular fluid.
- PACAP1-38 pretreatment significantly decreased the cell viability on JAR cells exposed to oxidative stress or hypoxia.
- Combination of PACAP1-38 and PACAP6-38 increased the phosphorylation of ERK1/2 és JNK/SAPK signal transduction pathways, but it decreased the activation of p38MAPK.

- Neither PACAP1-38, nor PACAP6-38, nor combined application had antiapoptotic effect on JAR cells against MTX treatment.
- PACAP1-38 and H₂O₂ together decreased the activation of ERK1/2 and p38MAPK in JAR cells.
- Neither PACAP1-38, nor PACAP6-38, nor combined application had antiapoptotic effect on HIPEC65 cells against MTX treatment.
- PACAP1-38 decreased the invasion but increased the proliferation of HIPEC65 cells. PACAP6-38 significantly increased the proliferation of HIPEC cells.

Publications related to the thesis:

Brubel R, Reglődi D, Jámor É, Koppán M, Várnagy Á, Bíró Zs, Kiss P, Gaál V, Matkovits A, Farkas J, Lubics A, Bódis J, Bay Cs, Veszprémi B, Tamás A, Németh J, Márk L. Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry. J Mass Spectr 2011;46: 189-94 (IF: 3.411)

Brubel R, Boronkai Á, Reglődi D, Rácz B, Németh J, Kiss P, Lubics A, Tóth G, Horváth G, Varga T, Szőgyi D, Fónagy E, Farkas J, Barakonyi A, Bellyei Sz, Szereday L, Koppán M, Tamás A. Changes in the expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the human placenta during pregnancy and its effects on the survival of JAR choriocarcinoma cells. J Mol Neurosci 2010;42: 450-458. (IF: 2.72)

Boronkai Á, **Brubel R**, Rácz B, Tamás A, Kiss P, Horváth G, Lubics A, Szigeti A, Bellyei Sz, Tóth G, Lakatos A, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on the survival and signal transduction pathways in human choriocarcinoma cells. Ann N Y Acad Sci 2009; 1163: 353-357 (IF: 2.67)

Reglődi D, Börzsei R, Bagoly T, Boronkai Á, Rácz B, Tamás A, Kiss P, Horváth G, **Brubel R**, Németh J, Tóth G, Helyes Zs. Agonistic behavior of PACAP6-38 on sensory nerve terminals and cytotrophoblast cells. J Mol Neurosci 2008;36: 270-278. (IF: 2.061)

Publications not related to the thesis:

Brubel R, Horváth G, Reglődi D, Lubics A, Tamás A, Kiss P, László E, Németh J, Márk L, Szakály P. Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor in the rat kidney. Transplant Proc 2011; 43: 1297-1299. (IF: 0,994)

Szakály P, László E, Kovács K, Rácz B, Horváth G, Ferencz A, Lubics A, Kiss P, Tamás A, **Brubel R**, Oppert B, Baba A, Hashimoto H, Farkas J, Matkovits A, Magyarlaci T, Helyes Zs, Reglődi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) show increased susceptibility to in vivo renal ischemia/reperfusion injury. Neuropeptides. 2011;45:113-21 (IF: 2.036)

Czeplédi L, Tamás A, Börzsei R, Bagoly T, Kiss P, Horváth G, **Brubel R**, Németh J, Szalontai B, Szabadfi K, Jávora A, Reglődi D, Helyes Zs. Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals. Gen Comp Endocrinol. 2011;172:115-9 (IF: 2.732)

Horváth G, Márk L, **Brubel R**, Szakály P, Rácz B, Kiss P, Tamás A, Helyes Zs, Lubics A, Hashimoto H, Baba A, Shintani N, Fürjes G, Németh J, Reglődi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide display increased sensitivity to renal oxidative stress in vitro. Neurosci Lett 2010;469: 70-74 (IF: 1.925)

Horváth G, **Brubel R**, Kovács K, Reglődi D, Oppert B, Ferencz A, Szakály P, László E, Hau L, Kiss P, Tamás A, Rácz B. Effects of PACAP on oxidative stress-induced cell death in rat kidney and human hepatocyte cells. J Mol Neurosci 2010;484(2):148-52. (IF: 2.72)

Horváth G, Reglődi D, Oppert B, **Brubel R**, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Csernus V, Matkovits A, Rácz B. Effects of PACAP on the oxidative stress-induced cell death in chicken pinealocytes is influenced by the phase of the circadian clock. Neurosci Lett 2010;484:148-152 (IF:1.925)

Impact factor of all publications (abstracts not included): **23,194**